

醤油の新規連続生産法に関する研究

著者	濱田 孝司
号	438
発行年	1991
URL	http://hdl.handle.net/10097/16757

氏 名(本籍) ^{はま}濱 ^だ田 ^{たか}孝 ^し司

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 第 4 3 8 号

学位授与年月日 平 成 3 年 11 月 14 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 醤油の新規連続生産法に関する研究

論文審査委員(主 査) 教 授 一 島 英 治
教 授 小 島 邦 彦
教 授 伊 崎 和 夫
助教授 中 島 佑

論文内容要旨

序 論

醤油は、優れた香味をもつ我が国の伝統的調味料である。最も一般的な濃口醤油（以下醤油）の製造法は、大きく分けて製麹、仕込み、製成の3つの工程から成っている（図1）。この中で、麹と食塩水が仕込まれてできた諸味では、乳酸発酵、アルコール発酵、加えて、熟成に6ヵ月以上という長期間を要する。また、諸味は高濃度の食塩を含むため、耐塩性を有する限られた乳酸菌（*Pediococcus halophilus*）、酵母（*Zygosaccharomyces rouxii*、*Candida versatilis*、*Candida etchellsii* 等）だけが活動し、*P. halophilus* により乳酸や酢酸等の有機酸が、そして、*Z. rouxii* により多種類の香気成分、また、*C. versatilis* により4-エチルグアヤコール等のフェノール化合物が生成され、醤油の香味が醸成される。

近年、バイオリアクター技術の発展はめざましいものがあり、従来の生産効率を飛躍的に高めることが可能となった。そのため、食品製造への応用研究も活発に行なわれている。前述のように、醤油の製造においては諸味の発酵、熟成に長期間を要するため、この工程に固定化微生物を用いたバイオリアクターを利用すれば、短時間での旺盛な発酵が可能となり、大幅な製造期間の短縮が期待できると考えられる。

本研究は、醤油の効率的生産システムを確立することを目的として、固定化乳酸菌、固定化酵母を基本としたバイオリアクターシステムによる醤油の連続生産を中心に、各成分の生成に及ぼす固定化菌と遊離菌の寄与、さらに、連続培養による醤油酵母の大量生産法について検討を行なったものである。その結果、醤油の製造期間を従来法（本醸造方式）に比べ大幅に短縮することが可能となり、醤油の新しい製造システムを確立したものである。

第1章 固定化 *Zygosaccharomyces rouxii* による醤油の連続発酵

Z. rouxii は、醤油酵母の中でも醤油の香りに最も重要な役割を果たす酵母である。そこで、アルギン酸で固定化した *Z. rouxii* によるアルコール発酵の最適条件についてエタノール生成量を指標として検討を行なった¹⁾。発酵原液は麹の加水分解より得られた液を除菌処理して使用し、また、リアクターについてはエアリフト型リアクター（ALR）を用いた（図2）。最初に、ゲル充填率を30%と

し、滞留時間を変えて *Z. rouxii* による連続発酵試験を行なった結果、エタノール生成量は滞留時間の増加とともに高くなり、本醸造方式で 2~3 ヶ月かけて生成される 2~3% のエタノールが、25~30 時間の滞留時間で生成されることがわかった。pH に関しては、3.5~5.5 の間で旺盛なアルコール発酵が認められたが、ゲル及び発酵液中の生菌数は 4.5~6.0 で最大となっており、4.5~5.5 が最適と考えられた。食塩濃度に関しては、10% を越えるとエタノールの生成量は徐々に低下したが、10% 未満では雑菌汚染の危険もあるため、13% 程度が適当ではないかと考えられた。温度に関しては、エタノール生成量は 25~30℃ で最大となっていたが、ゲル中の生菌数は 18~27.5℃ という比較的低温側で高いレベルで保持されており、25~27.5℃ が最適と考えられた (図 3 A)。通気に関しては、エアー単独での通気に比べ、通気ガス中の窒素の比率を多くするとエタノール生成量は低下し、酸素移動速度がアルコール発酵に大きく影響することがわかった。特に、窒素単独で通気を行なった場合は、エタノール量、ゲル及び発酵液中の菌数の顕著な減少が認められた (図 3 B)。約 3% のエタノールを生成させるためには、滞留時間を 28 時間とした場合 0.15 mmol/l/h 以上の酸素移動速度が必要と考えられた。A L R での固定化 *Z. rouxii* による連続発酵は、滞留時間及び通気条件を変えても約 50 日間トラブルもなく、さらに、再現性良く継続できた。A L R は、従来利用されている流動層型リアクターに比べ、エタノール生成量の変動が少ないため、固定化 *Z. rouxii* による連続発酵には有効なリアクターと考えられた。

第 2 章 固定化 *Candida versatilis* による 4-エチルグアヤコールの連続生産

C. versatilis は、4-エチルグアヤコール (4-E G) のようなフェノール化合物を生成し、特徴的な香りを醤油に付与する酵母である。この 4-E G の醤油における最適濃度は 1~3 ppm であることが知られている。そこで、*Z. rouxii* による発酵液の香りをさらに向上させることを目的として、固定化 *C. versatilis* による 4-E G の連続生産について、ゲル充填率を 30% とし、A L R を用いて検討を行なった²⁾。発酵原液は *Z. rouxii* の場合と同様、麴の加水分解液を用いた。pH が 4.0~5.0 において、ゲル及び発酵液中の生菌数は高いレベルで保持されていたが、4-E G の生成量は 3.5~4.0 で最大となり、最適 pH は 4.0 付

近と考えられた。この値はエタノール生成の最適 pH (5.0 付近) とは異なっていた。温度に関しては、4-E G の生成量は 30~33℃ で最大となっており、ゲル及び発酵液中の菌数もこの範囲で高いレベルにあることから、30℃ 付近が最適と考えられた。また、通気ガス中の窒素の比率を上げるとゲル及び発酵液中の生菌数は若干低下したが、4-E G の生成量にはほとんど変化が認められなかった (図 4 A)。この結果は、通気ガス中の酸素分圧の影響を大きく受ける *Z. rouxii* のアルコール発酵の結果とは異なっていた。次に、4-E G の生成に及ぼす滞留時間の影響について検討を行なったところ、5 時間以上の滞留時間では 20 ppm という著量の 4-E G が生成された。さらに、1~3 ppm という醤油における 4-E G の最適濃度は、わずか 0.5 時間程度の滞留時間で充分生成されることがわかった (図 4 B)。このように、*C. versatilis* においては、固定化菌体を用いることにより、短時間で効率良く 4-E G が生産されることが明らかとなった。

第 3 章 連続培養による醤油酵母の大量生産

近年、醤油醸造においては旺盛なアルコール発酵を行なわせるため、スターターとして *Z. rouxii* 等の種酵母の添加が一般的となっている。また、上記バイオリアクターを作製する場合も種酵母が必要となる。そこで、これら酵母の効率的生産を目的として、培養中の基質及び生産物濃度を一定に維持でき、高い生産性が得られる連続培養について、*Z. rouxii* を用いて検討を行なった³⁾。培地は酵母の生育に好適なグルコースと醤油から成る培地を用い、雑菌の汚染を防ぐため 10% 食塩存在下で、Working volume 2 l (5 l ミニジャー)、攪拌数 400~700 rpm、通気 1 vvm、温度 30℃ とし、pH 及び希釈率 (DR) を変えながら連続培養を行なった。その結果、培養の最適 pH は 5.0 付近であり、また、培地の最適 C/N 比は 16~20 であった。グルコース制限下での培養においては、希釈率の上昇とともに生菌数が増加し、希釈率が 0.06~0.08 h⁻¹ の時最大菌数 (1.5~1.7 x 10⁹/ml) が得られ、また、その生産性も最大 (9~12 x 10¹⁰/l/h) となった (図 5 B)。これらの値は回分培養における約 5 倍の値であり、連続培養では菌数及びその生産性が顕著に増加することが明らかとなった。上記培養においては、残存グルコース濃度は 35~55 ppm、エタノール濃度は 100 ppm 未満と低いレベルに抑えられており、このことが菌数増加の要因となっているものと

考えられた。また、溶存酸素（DO）制限下での培養ではグルコース制限下ほど生菌数の増加は認められなかった（図5A）。一方、グルコース制限下での培養で得られた菌の発酵力は、回分培養及びDO制限下での培養で得られた菌に比べ顕著に減少していた（図6）。解糖系酵素の活性を測定したところ、グルコース制限下での培養では、ほとんどの酵素の比活性が後者の2つに比べ減少しており、このことが発酵力低下の原因の1つではないかと推察された。次に、DOと生菌数及び発酵力の関係について検討を行なった結果、グルコースとDO制限の境界の条件で培養することにより、生菌数も高いレベルで維持され、加えて、菌の発酵力もかなり高くなることが明らかとなった（表1）。他の醤油酵母（*Z. rouxii* 2株及び *C. versatilis* 2株）についても連続培養を行なったところ、生菌数及びその生産性が著しく増加することより、連続培養法は醤油酵母の生産に非常に有効な方法であることがわかった。現在、この連続培養法は種酵母の製造に一部実用化されている。

第4章 *Zygosaccharomyces rouxii* 及び *Candida versatilis* の固定化菌と遊離菌のエタノール及び4-エチルグアヤコール生成に対する寄与

これまで、固定化 *Z. rouxii* によるアルコール発酵及び固定化 *C. versatilis* による4-EGの生産について検討を行なったが、その過程で発酵液中にも遊離菌がかなり存在することがわかった。そこで、リアクターを効率的に活用することを目的として、両酵母のゲルに固定化された菌と遊離菌が、エタノール及び4-EGの生成にどの程度関与しているのか検討を行なった⁴⁾。エタノールについては、遊離菌により生成される量が *Z. rouxii* では全体の約65%、*C. versatilis* では約90%に達し、遊離菌のエタノール生成に対する寄与が固定化菌より高いことが明らかとなった（図7A）。これにより、*C. versatilis* ではほとんどのエタノールが遊離菌により生成されることがわかった。また、エタノールの比生産性（エタノール生成量/h/cell）を求めたところ、*Z. rouxii* では固定化菌の比生産性が遊離菌の約28%、*C. versatilis* では約3%と顕著に減少していた（表2）。この原因については、ゲルの表面は菌が密に存在しているためエタノール濃度が高くなっており、その結果、ゲルに固定化された菌がこのエタノールによりダメージを受けているためではないかと推察された。一方、*C. versa-*

tilis による4-E Gの生成においては、エタノール生成の場合とは全く異なり、固定化菌によりほとんど生成され（約 80%）、遊離菌では全4-E Gの 20% 程度しか生成されなかった（図 7 B）。しかしながら、C. versatilis の固定化菌と遊離菌における4-E Gの比生産性（4-E G生成量/h/cell）には、両者で大きな違いは認められないことから（表 2）、固定化菌と遊離菌の菌数の差が4-E G生成量の違いを反映しているものと推察された。以上のことより、Z. rouxii 及び C. versatilis においては、固定化菌のみならず遊離菌も各成分の生成に寄与していることが明らかとなった。

第5章 バイオリアクターシステムによる醤油の連続生産

本章では、醤油の効率的生産を目的として、固定化グルタミナーゼ、固定化 P. halophilus、固定化 Z. rouxii 及び固定化 C. versatilis の各リアクターを組合せたパイロットスケール（20 l/日）でのバイオリアクターシステムによる醤油の連続生産について検討を行なった⁵⁾。大豆と小麦を麴菌の連続培養で得られた酵素液により分解し、これを発酵原液（TN 2%、NaCl 13%）として表 3 に示した条件でグルタミナーゼリアクター、P. halophilus リアクターに通し、その後、並列に接続した Z. rouxii リアクターと C. versatilis リアクターに通し、ここでは4-E Gの最終濃度が約 1 ppm となるように両カラム通過液を 10:1 の比でブレンドするようにした（図 8）。その結果、100 日以上に亘り、グルタミン酸については 0.3~0.4% の増加が安定に継続し、また、乳酸も本醸造醤油と同程度の 0.7~1.0% 生成され、その結果、pH は目標とする 4.9~5.0 まで低下した。さらに、アルコール発酵の指標となるエタノールも、本醸造方式と同程度の約 2.5% が滞留時間をほとんど変えることなく安定に生成された。4-E Gについては C. versatilis リアクター通過後で約 10 ppm 生成され、その結果、Z. rouxii リアクター通過液と混合した後では約 1 ppm となり、適正な範囲でコントロールすることができた（図 9）。またこの間、雑菌の汚染は認められなかった。乳酸発酵、アルコール発酵及び4-E Gの生成については上記バイオリアクターを用いることにより、本醸造方式では 2~3ヵ月かかるところを約 2 日間の滞留時間でほぼ目標通りの水準に達することができた。また、香気成分については、バイオリアクターにより得られた醤油（バイオリアクター醤油）は、本醸造醤油

と定性的には差はみられなかったが、定量的にみるとイソアミルアルコール、アセトインが多く、逆に、乳酸エチル、4-ヒドロキシ-2(or5)-エチル-5(or2)-メチル-3(2H)-フラノン、4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フラノンが少なく、若干の違いが認められた(表4)。しかしながら、官能検査においては、バイオリアクター醤油は芳香、新鮮な香り等が多少弱いという評価であったが、全体的なレベルにおいては本醸造醤油にかなり近いという評価が得られた(図10)。また、麴の加水分解液を発酵原液として用いた試験も行なったが、成分及び官能的にも上記とほぼ同様の結果が得られた。

以上、本バイオリアクターシステムを用いることにより、醤油の製造期間を本醸造方式に比べ、約 1/10 と大幅に短縮することが可能となり、さらに、品質的にも本醸造醤油と遜色ないものを得ることができた。

結 論

醤油の効率的生産システムを確立することを目的として、固定化グルタミナーゼ、固定化 *P. halophilus* 及び固定化酵母 (*Z. rouxii*, *C. versatilis*) から成るバイオリアクターシステムによる醤油の連続生産、加えて、連続培養による酵母の大量生産について検討を行なった。醤油酵母の連続培養においては、その培養法を確立し、生菌数及びその生産性を回分培養に比べ顕著に増加させることに成功した。バイオリアクターシステムによる醤油の生産においては、100 日以上に亘り、乳酸発酵、アルコール発酵及び4-E Gの生産を安定に、かつ、本醸造方式とほぼ同じ水準で継続させることができた。さらに、製造に要する期間を本醸造方式の約 1/10 まで短縮することを可能とし、醤油の品質においても本醸造醤油と遜色ないものを得ることができた。また、固定化酵母リアクターにおいては、固定化菌のみならず遊離菌も各成分の生成に対して大きな役割を果していることを明らかにすることができた。本バイオリアクターシステムは醤油の生産に有効な方法と考えられ、工業規模による利用が期待されている。

原 著 論 文

- 1) T. Hamada, T. Ishiyama and H. Motai, Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, 346-350 (1989)
- 2) T. Hamada, M. Sugishita and H. Motai, J. Ferment. Bioeng., 3, 166-169 (1990)
- 3) T. Hamada, Y. Fukushima, H. Hashiba and H. Motai, Appl. Microbiol. Biotechnol., 印刷中 (1991)
- 4) T. Hamada, M. Sugishita and H. Motai, Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 624-628 (1990)
- 5) T. Hamada, M. Sugishita, Y. Fukushima, T. Fukase and H. Motai, Process Biochem., 26, 39-45 (1991)

参 考 論 文

- 1) T. Hamada, T. Nakajima, K. Izaki and K. Matsuda, Eur. J. Biochem., 119, 365-371 (1981)
- 2) T. Hamada, T. Nakajima and K. Matsuda, Eur. J. Biochem., 119, 373-379 (1981)
- 3) T. Hamada, F. Noda and K. Hayashi, Appl. Environ. Microbiol., 48, 708-712 (1984)
- 4) 濱田孝司, 茂田井宏, 日本醸造協会誌, 84, 83-87 (1989)

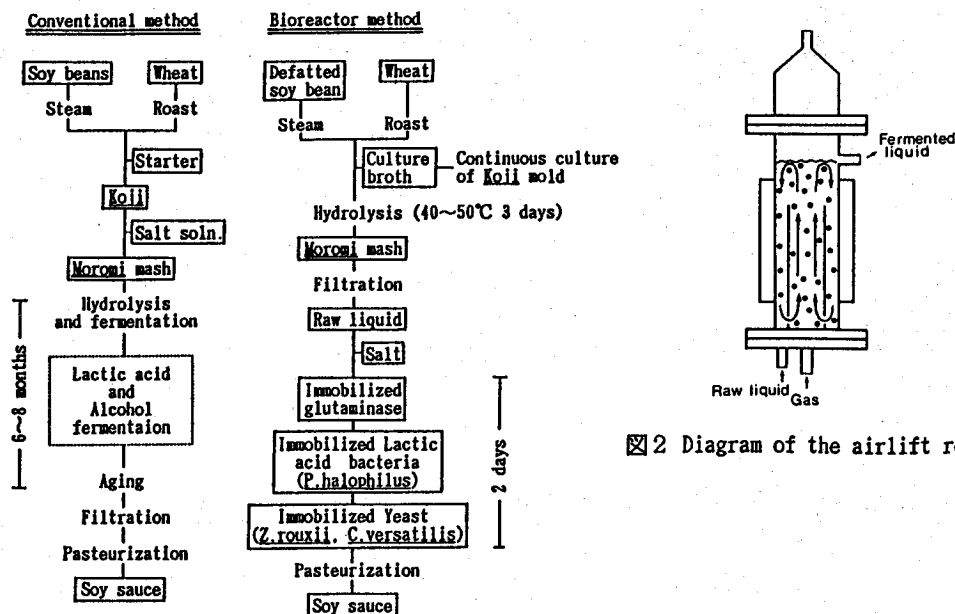


Figure 1 Manufacturing processes for soy sauce by conventional and bioreactor methods.

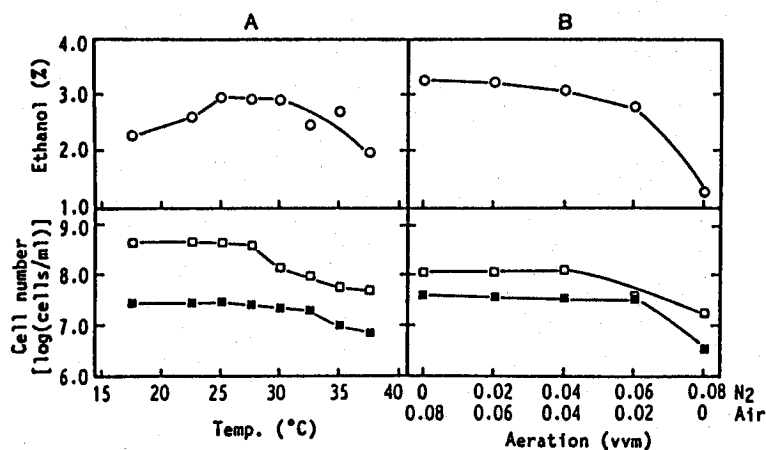


Figure 3 Effects of temperature (A) and aeration (B) on alcohol fermentation by immobilized *Z. rouxii* cells in the airlift reactor. Conditions were as follows: (A) pH, 5.0; NaCl, 12.5%; residence time, 28 h; gas flow rate, air 0.08 vvm. (B) pH, 5.0; NaCl, 12.5%; temperature, 27°C; residence time, 28 h. Cell number: □, in gel; ■, in fermented liquid.

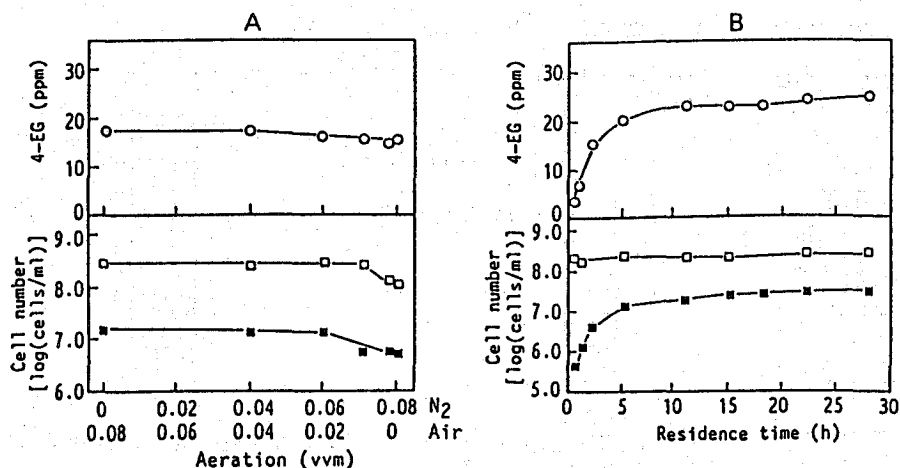


Fig. 4 Effects of aeration (A) and residence time (B) on the 4-EG production by immobilized *C. versatilis* cells in the airlift reactor. Conditions were as follows: (A) pH, 5.0; NaCl, 12.5%; temperature, 30°C; residence time, 5h. (B) pH, 5.0; NaCl, 12.5%; temperature, 30°C; gas flow rate, air 0.08 vvm. Cell number: □, in gel; ■, in liquid.

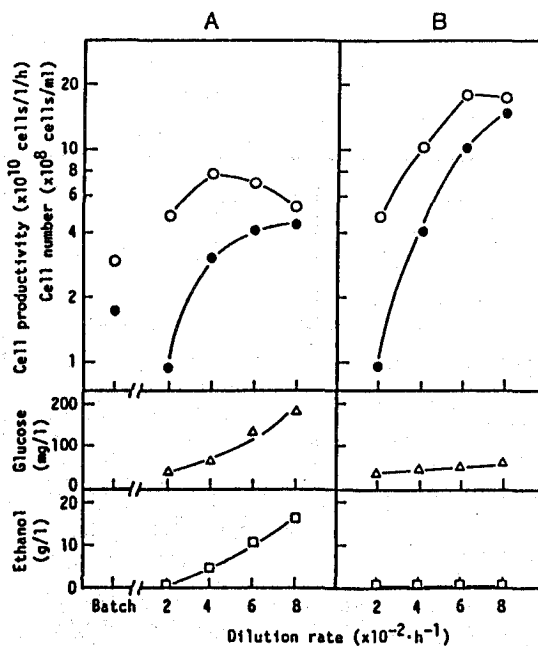


Fig. 5 Effect of dilution rate (DR) on the production of viable cells of *Z. rouxii* in continuous cultures. Agitation speed (A), 400 rpm; (B), 600-700 rpm. Oxygen was supplied in addition to air to maintain DO above 20% air saturation at DR of 0.08 h⁻¹. (○), viable cell number; (●), productivity; (Δ), glucose; (□), ethanol.

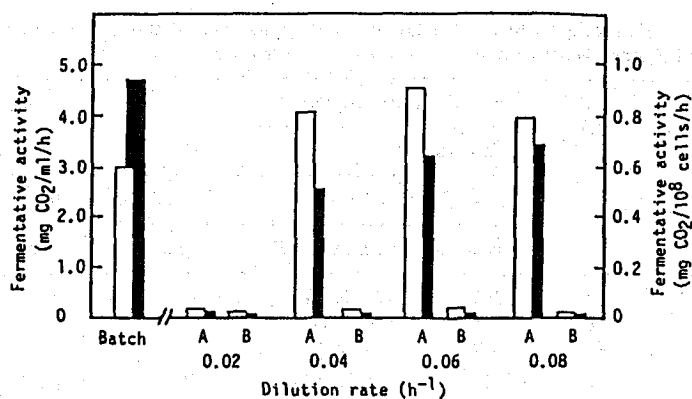


Fig 6 Fermentative activity of *Z. rouxii* cells from continuous cultures. Agitation speed (A), 400 rpm; (B), 600-700 rpm. Oxygen was supplied in addition to air to maintain DO above 20% air saturation at DR of $0.08\ h^{-1}$. (□), activity per broth; (■), activity per 10^8 cells.

表1 Relationship between viable cell number and fermentative activity at different agitation speed

DO ^{a)}	Agitation (rpm)	Cell number ($\times 10^8$ cells/ml)	Fermentative activity	
			($mg\ CO_2/ml/h$)	($mg\ CO_2/10^8\ cells/h$)
-	400	7.0	4.54	0.65
3	550	15.2	5.38	0.35
>20	700	16.7	0.21	0.013

Continuous cultures were done at DR of $0.06\ h^{-1}$.

^{a)} Values indicate percentage against DO tension of air saturation.

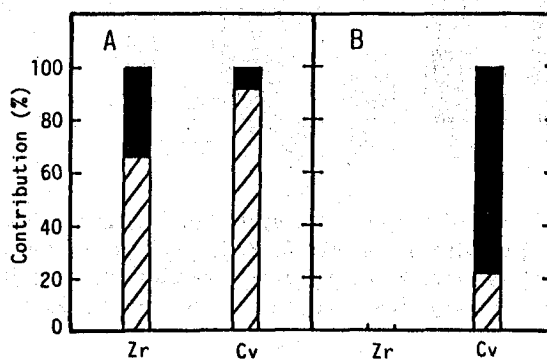


Fig 7 Contribution of immobilized (■) and free (□) cells to the production of ethanol (A) and 4-EG (B): Zr, *Z. rouxii*; Cv, *C. versatilis*.

表2 Specific productivities of ethanol and 4-ethylguaiacol (4-EG) in immobilized and free cells of *Zygosaccharomyces rouxii* and *Candida versatilis*

Yeast	LRT (h)	Specific productivity ^a			
		Ethanol		4-EG	
		(10 ⁻¹⁰ g/h/cell)		(10 ⁻¹⁰ µg/h/cell)	
		Free	Immobilized ^b	Free	Immobilized ^b
<i>Z. rouxii</i>	14	362	125 (0.35)	—	—
	18	495	118 (0.24)	—	—
	22	379	98 (0.26)	—	—
<i>C. versatilis</i>	14	267	14 (0.052)	119	151 (1.27)
	18	315	10 (0.032)	120	118 (0.98)
	22	320	5 (0.016)	121	96 (0.79)

^a Specific productivity is defined as the amount of ethanol and 4-EG produced per hour per cell.

^b Values in parentheses indicate the ratio of the specific productivity in immobilized cells to that in free cells.

LRT=liquid residence time.

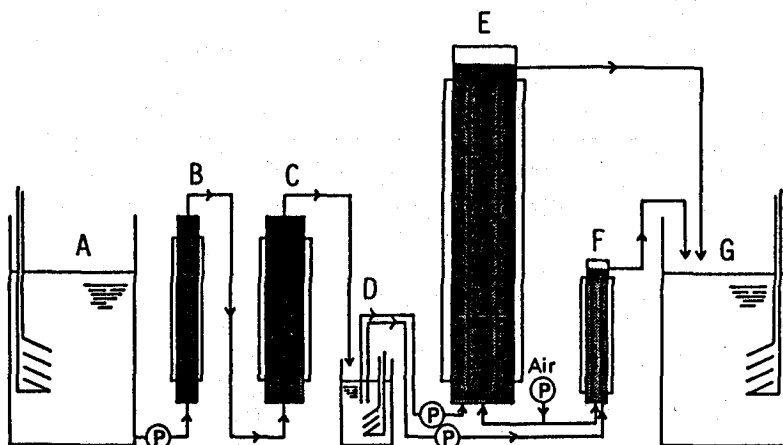


图8 Schematic diagram of a bioreactor system for soy sauce production. A, feed tank; B, glutaminase reactor; C, *P. halophilus* reactor; D, buffer tank; E, *Z. rouxii* reactor; F, *C. versatilis* reactor; G, product tank; P, feed pump; Air-P, air pump. Feed and product tanks were held at 5°C.

表3 Conditions of fermentation in each reactor

Reactor	Carrier	Column vol. (L)	Packed gel vol. (L)	Residence time (h)	Temp. (°C)	Aeration (vvm)
Glutaminase	Chitopearl	1.8	0.6	0.7	40	—
<u>P. halophilus</u>	AS	7.5	5.0	6.1	27	—
<u>Z. rouxii</u>	Al	27.0	8.0	25.5	27	0.005
<u>C. versatilis</u>	Al	1.0	0.2	10.7	27	0.08

AS:Alginate-colloidal silica.

Al:Alginate.

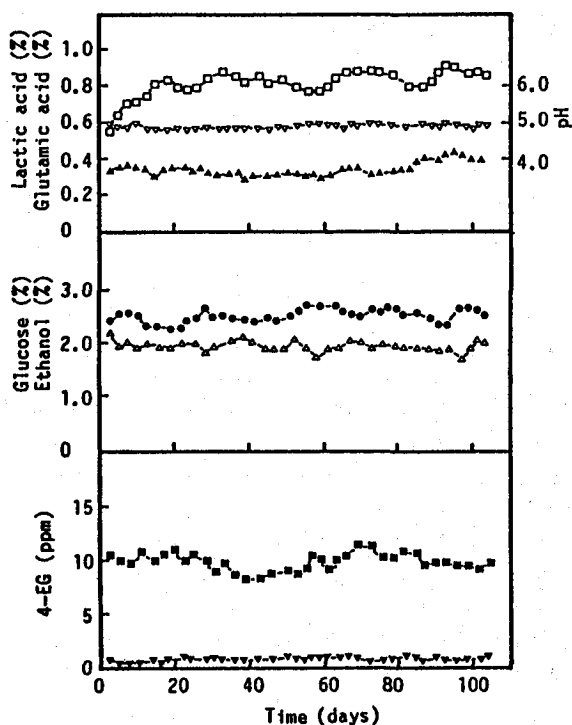


图9 Profile of continuous fermentation of soy sauce by a bioreactor system. (□), lactic acid; (Δ), glutamic acid (values indicate the increase in amount of glutamic acid); (▽), pH; (●), ethanol; (Δ), glucose; (■), 4-EG after passing through the C. versatilis reactor; (▼), 4-EG in final product.

表4 Aroma components of bioreactor soy sauce

Sample (days elapsed)	Component ^{a)} (mg/l)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
60 ^{b)}	13.5	3.2	33.7	30.0	3.2	7.7	1.3	9.7	2.1	0.8	13.0	39.0
100 ^{b)}	17.2	3.6	50.4	28.0	2.3	6.6	1.9	15.8	3.1	1.0	13.6	39.2
Control ^{b)}	13.6	13.6	11.1	9.9	16.8	7.9	3.5	8.1	2.5	1.4	55.3	76.0

^{a)} Concentrations of total nitrogen and NaCl were adjusted to those of conventional soy sauce

^{b)} Conventional soy sauce

^{c)} 1 isobutyl alcohol, 2 *n*-butyl alcohol, 3 isoamyl alcohol, 4 acetoin, 5 ethyl lactate, 6 furfuryl alcohol, 7 methionol, 8 2-phenylethanol, 9 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, 10 4-ethylguaiacol, 11 4-hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone, 12 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone.

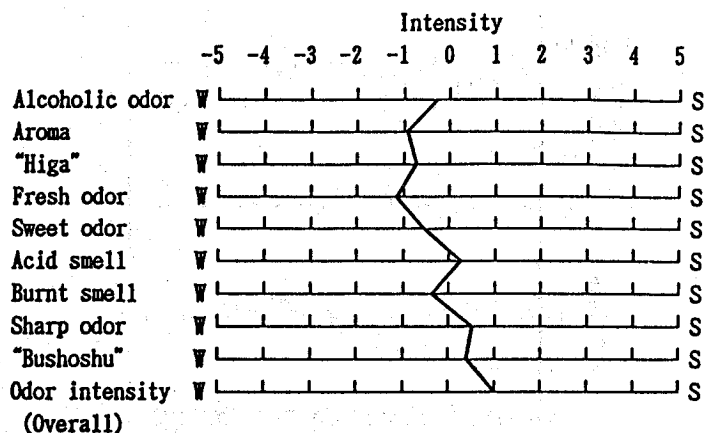


图10 Intensity of odors of bioreactor soy sauce compared with those of conventional sauce. Higa, baking aroma; Bushoshu, foully fermented smell or foreign flavor. S, strong; W, weak.

審査結果の要旨

わが国の伝統的醸酵食品である醤油の醸造法は製麹、仕込熟成、製成の工程を含み、とくに醤油諸味の熟成過程は半年から1年の長い年月を必要とする。本研究は醤油の効率的な生産システムを確立する目的で、従来からの技法にとらわれない新規な方法を導入し、醤油の連続生産法を開発したものである。

本研究は脱脂大豆と炒小麦を培地とし13%食塩存在下で連続的に麹菌を液体培養し、ろ過したタンパク分解液を以下の工程に供した。醤油の香りに最も重要な役割を果たす耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* をアルギン酸で固定化し、エアリフト型リアクターで25~27.5℃、pH4.5~5.5の最適条件を見出した。約3%のエタノールを生成させるために滞留時間を28時間とした場合0.15mmol/l/h以上の酸素移動速度が必要であることを明らかにした。バイオリアクターを用い50時間の連続醸酵を可能とした。

次いで、醤油の後熟酵母 *Candida versatilis* を固定化し、醤油の特徴的な香気である4-エチルグアヤコール（4-EG）の連続生産条件を明らかにした。最適pH4.0、30~33℃で、5時間以上の滞留時間で20ppmという著量の4-EGの生産をみた。

以上の各バイオリアクターに供給するための耐塩性酵母の連続培養による大量生産条件を検討した。培地はグルコースと醤油からなる培地で、10%食塩存在下、pH5.0付近、培地のC/N比は16~20、希釈率は0.06~0.08h⁻¹の時、最大菌数9~12×10¹⁰/l/hが得られた。解糖系酵素群の活性測定値をもとに解析を加え、溶存酸素（DO）、生菌数、醸酵力の関係の検討を行い両株の酵母の連続培養法に成功した。さらに、バイオリアクター内の固定化菌と遊離菌のエタノール並びに4-EG生産に対する寄与率を明らかにした。この連続培養法は現在実用化されている。

以上の知見をもとに、20l/日のパイロットスケールでの醤油の連続生産システムを構築した。従来からの醸造方式では約2~3ヶ月はかかるところが、本研究により約2日の滞留時間で醤油の製造が可能となった。香気並びに呈味について、成分分析、官能検査によって、本連続生産システムの醤油は醸造醤油と比べ遜色のない品質のものを得ることに成功した。

以上の結果、審査員一同本研究者に対し博士（農学）の学位を授与するに値するものと認定した。